

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1930

N^o 67

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(Diplôme d'Etat)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1930

PAR

NÉANT Max-Jean-Paul-Félix

Né le 13 Juin 1904, au Bignon-Mirabeau (Loiret)

Des différentes Méthodes bactériologiques en vue du Diagnostic du Charbon bactéridien

JURY :

	Président :	M. A. LEMIERRE,	Professeur à la Faculté de Médecine.
Assesseurs		M. L. PANISSET.	Professeurs à l'Ecole Nationale
		M. J. VERGE.	Vétérinaire d'Alfort

PARIS

IMPRIMERIE « LES PRESSES MODERNES »
45, rue de Maubeuge, Paris

1930

*Des différentes Méthodes bactériologiques
en vue du Diagnostic du Charbon bactérien*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Année 1930

N^o 67

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(Diplôme d'Etat)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1930

PAR

NÉANT Max-Jean-Paul-Félix

Né le 13 Juin 1904, au Bignon-Mirabeau (Loiret)

Des différentes Méthodes bactériologiques en vue du Diagnostic du Charbon bactérien

JURY :

Président : M. A. LEMIERRE, Professeur à la Faculté de Médecine.

<i>Assesseeurs</i> }	M. L. PANISSET.	Professeurs à l'Ecole Nationale
	M. J. VERGE.	Vétérinaire d'Alfort

PARIS

IMPRIMERIE « LES PRESSES MODERNES »

45, rue de Maubeuge, Paris

1930



PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Directeurs honoraires : MM. P.-J. CADIOT et H. VALLÉE

Directeur : M. E. NICOLAS

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général honoraire
des Ecoles vétérinaires : P.-J. CADIOT, A. RAILLIET, H. VALLÉE.

PROFESSEURS ET CHARGÉS DE COURS

	MM.
Anatomie descriptive des animaux domestiques.....	BRESSOU.
Physiologie, thérapeutique générale.....	MAIGNON.
Physique et chimie médicales, toxicologie, pharmacie.....	NICOLAS.
Parasitologie et maladies parasitaires, clinique; Zoologie.....	HENRY.
Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, clinique; sémiologie et propédeutique, jurisprudence.....	ROBIN.
Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, cli- nique : anatomie chirurgicale, médecine opératoire et fer- rure.....	COQUOT.
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, clinique; médecine opératoire, obstétrique.....	LESBOUYRIES
Pathologie générale et microbiologie, maladies microbiennes et police sanitaire, clinique.....	PANISSET.
Histologie et embryologie, anatomie pathologique; autopsies.	PETIT.
Zootéchnie et économie rurale.....	DECHAMBRE.
Agronomie, botanique et hygiène; matière médicale.....	DECHAMBRE et HENRY.
Industrie et contrôle des produits d'origine animale.....	VERGE.

PROFESSEUR AGRÉGÉ

M. LESBOUYRIES

CHEF DE TRAVAUX AGRÉGÉ

M. SIMONNET.

CHEFS DE TRAVAUX

MM MONVOISIN. — MOUSSU (R.)

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opi-
nions émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur
donner ni approbation, ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MON PÈRE

Chevalier de la Légion d'Honneur

ET A MA MÈRE

*Hommage d'amour filial et de reconnaissance
infinie.*

*Leur vie de labeur et de sacrifice a été pour
moi un exemple.*

A MA FEMME

En toute affectueuse tendresse.

A MES BEAUX-PARENTS

En remerciement de leurs bontés pour moi.

A MA FAMILLE

A LA FAMILLE DE MA FEMME

A MES AMIS

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. LEMIERRE

Professeur à la Faculté de Médecine
Chevalier de la Légion d'Honneur

*Remerciements respectueux pour le grand hon-
neur qu'il nous a fait en acceptant la prési-
dence de notre Jury de Thèse.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PANISSET

Chevalier de la Légion d'Honneur

ET A MONSIEUR LE PROFESSEUR VERGE

Membres de notre Jury de Thèse

*Hommage de notre reconnaissant souvenir et
de nos plus respectueux sentiments.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VALLÉE

Membre de l'Académie de Médecine
Commandeur de la Légion d'Honneur

*Qui a bien voulu nous inspirer le sujet de cette
Thèse. Nous le prions d'agréer nos senti-
ments de vive admiration, de sincère recon-
naissance et de profond respect.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR NICOLAS

Directeur de l'Ecole d'Alfort
Officier de la Légion d'Honneur

Hommage de notre très respectueuse gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR COQUOT

Chevalier de la Légion d'Honneur

En témoignage de respect et d'infinie reconnaissance pour le bienveillant intérêt qu'il nous a porté durant toutes nos études à l'Ecole d'Alfort.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GABRIEL PETIT

Membre de l'Académie de Médecine

Chevalier de la Légion d'Honneur

En témoignage de notre vive reconnaissance pour l'accueil si bienveillant qu'il nous a fait à son laboratoire et de nos plus respectueux sentiments.

A MONSIEUR RINJARD

Chevalier de la Légion d'Honneur

En témoignage de notre vive reconnaissance pour les conseils précieux qu'il nous a prodigués au cours de nos travaux de Thèse.

A TOUS NOS MAITRES DE L'ECOLE D'ALFORT

*Hommage de reconnaissance et de respect
pour l'enseignement qu'ils nous ont donné.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR CHAUVEAU

Sénateur et Président du Conseil Général de la Côte-d'Or
Conseiller général d'Arnay-le-Duc
Chevalier de la Légion d'Honneur

*Hommage de vive et respectueuse reconnais-
sance.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR MOQUET

de la Faculté de Médecine de Montpellier
Chevalier de la Légion d'Honneur

*Hommage de vive gratitude et d'affectueux
respect.*

Généralités

La fièvre charbonneuse a été longuement étudiée dans tous les pays à cause de sa gravité lorsqu'elle sévit sur nos animaux domestiques. Les recherches faites à son sujet et sur la bactériémie de Davaine sont innombrables ; le diagnostic expérimental, cependant facile en apparence, est embarrassant parce qu'on ne met pas toujours en évidence la bactériémie dans les organes des animaux qui ont succombé à l'infection. Or, avant d'appliquer les mesures de prophylaxie, avant d'entreprendre un traitement rationnel, il importe de poser un diagnostic sûr.

La nature de la maladie ne peut être scientifiquement déterminée que par la découverte de l'agent qui en est la cause. La clinique seule paraît insuffisante dans beaucoup de cas et l'examen bactériologique du cadavre sur place est chose presque impossible pour un praticien : il faudrait qu'il dispose d'un matériel encombrant et du temps nécessaire pour faire toutes les recherches bactériologiques que comporte un examen de ce genre, ce qui est à peu près irréalisable pour un vétérinaire à la campagne.

D'autre part, le charbon bactériodien prête à confusion avec d'autres maladies microbiennes, tant au point de vue

symptômes généraux, qu'au point de vue anatomo-pathologique : la température qui monte vite, les signes de coliques de congestion, les œdèmes, l'urine colorée, autant de signes insuffisants pour le diagnostic dans bien des cas ; et l'évolution est parfois si rapide qu'on ne voit pas ces symptômes et que la rate n'a pas eu le temps de s'hypertrophier ni de devenir friable ; alors on est aux prises avec les plus grandes difficultés. D'ailleurs, tous les auteurs insistent sur la putréfaction rapide des cadavres, le ballonnement énorme, l'emphyème putride, l'écoulement de sang corrompu par les orifices naturels, etc..., tous phénomènes qui se rencontrent de même dans la plupart des infections sanguines généralisées.

En matière d'inspection des viandes, en ce qui concerne l'examen direct des quartiers, la difficulté est presque insurmontable pour rattacher uniquement la modification de la coloration des muscles, qui est saumonée, à un état charbonneux.

Il est donc nécessaire de mettre en œuvre les méthodes expérimentales de diagnostics et à ce point de vue le laboratoire est d'un secours immense et le complément indispensable de la clinique en matière de maladies contagieuses.

Au laboratoire, plusieurs moyens sont à notre disposition pour rechercher un agent pathogène : les colorations, les cultures, les inoculations, les procédés de sérologie ; leur association suffit bien souvent pour être ferme dans les résultats de l'examen. Nous passerons en revue ces différents mo-

des d'investigation rapportés à la fièvre charbonneuse, en insistant sur une réaction de très grande valeur et qui est utilisée journellement : le séro-diagnostic, appelé encore thermo-précipitation d'Ascoli.

Nous serons amené, au sujet de cette réaction type du charbon bactérien, à parler de la manipulation des produits charbonneux qu'on emploie pour faire un diagnostic; nous verrons quels sont les matériaux qu'on expédie au laboratoire et comment on les recueille sur le cadavre même. De nombreux moyens ont été employés pour se procurer des produits virulents, mais souvent ces produits sont putréfiés à leur arrivée et souillés par d'autres micro-organismes qui gênent considérablement le bactériologiste pour faire un diagnostic précis.

Nous avons pensé que l'addition d'antiseptiques en petites quantités au produit charbonneux, au moment même de son prélèvement sur le cadavre, serait suffisante pour empêcher cette putréfaction et ce développement de germes, ce qui rendrait la manipulation quelque peu plus agréable, tout en permettant de pratiquer sans cause d'erreur la réaction d'Ascoli qui, par sa rapidité d'exécution et sa facile interprétation, comme nous le verrons, reste encore le procédé de choix de diagnostic bactériologique.

L'agent causal de la maladie, la *Bactéridie de Davaine* ou *Bacillus anthracis* est, suivant la classification de Cohn, un Schizomycète de la famille des Desmobactéries et du genre Bacille. Il est formé de cellules végétales ayant un corps protoplasmique homogène et une membrane cellulaire bien mise en évidence par la teinture d'iode, de sorte que ce parasite a, dans certains milieux, une apparence capsulée. Cette capsule est de nature albuminoïde; il semble s'agir d'un glucoprotéide : absence de phosphore, présence de soufre, formation d'hydrate de carbone par hydrolyse. De Gratia fait apparaître cette gaine hyaline du bacille par l'action de la solution d'acide acétique à 1 %, après coloration au violet de méthyle, ce qui serait d'ailleurs un bon caractère de diagnostic de la bactéridie.

Cette dernière se multiplie par segmentation, les articles demeurant plus ou moins adhérents, et selon leur nombre on peut distinguer deux formes : la *forme bacillaire* sous laquelle on rencontre la bactéridie dans le sang et les tissus des animaux infectés; c'est un bâtonnet droit, transparent, cylindrique, avec des extrémités un peu renflées et coupées carrément, toujours absolument immobiles. Son épaisseur est de 1 μ à 1,5 μ , sa longueur est de 3 à 6 μ ; il est formé d'un seul article ou de deux ou de trois se tenant bout à bout. D'ailleurs, selon les espèces animales, comme le bacille de Koch, les dimensions varient.

L'autre forme, *filamenteuse*, ne se trouve dans l'orga-

nisme que dans le liquide de l'œdème; on la rencontre surtout dans les cultures en milieu liquide; la bactéridie présente alors une longueur parfois considérable, due au grand nombre d'articles soudés les uns aux autres; ces filaments apparaissent flexueux et forment un véritable chevelu.

Sa reproduction dans le sang et les tissus des animaux se fait uniquement par segmentation, mais en dehors de l'organisme c'est par la formation de spores, comme l'a démontré Koch. Les spores se forment dans les bactéridies filamenteuses et deviennent un petit corps ovoïde réfringent; quand elles sont formées, le filament se détruit et les met en liberté; transportées dans un milieu favorable, on peut suivre, en examinant au microscope des cultures en gouttes pendantes, toutes les phases de leur germination et de leur transformation en bacilles: la spore grossit, perd sa réfringence, son enveloppe se résorbe, son protoplasme bourgeonne et forme un nouveau bacille. Koch a bien déterminé les conditions nécessaires et suffisantes de la formation des spores dans les milieux de culture: il faut un apport abondant d'oxygène libre et une température favorable de 18° à 40°, la température optima étant aux environs de 30°. Cela explique pourquoi les spores ne se développent pas dans le cadavre d'un animal, et qu'au contraire, quand le cadavre est ouvert, l'air y pénètre et favorise la sporulation; aussi ne trouve-t-on pas de spores chez l'animal atteint de charbon et encore vivant. Les spores se forment d'autant plus en abondance que les élé-

ments nutritifs du milieu de culture vont en s'appauvrissant plus rapidement, ce qui explique bien la résistance du parasite qui donne ses formes les plus durables lorsque ses éléments mycéliens ne trouvent plus de conditions à leur développement.

Cependant, on peut empêcher la bactéridie de sporuler et le Docteur Roux a pu, par l'action des antiseptiques et de la chaleur, obtenir des bacilles asporogènes et former ainsi une race définitivement fixée.

L'étude microscopique de la bactéridie est facilitée surtout par la propriété qu'elle possède de se colorer d'une façon intense par les matières colorantes et notamment celles qui dérivent de l'aniline, ce qui permet de reconnaître les détails de sa structure et de la mieux distinguer dans les préparations. A cet effet, on emploie un certain nombre de méthodes, pour mettre en évidence soit la bactéridie, soit la capsule qui entoure le bâtonnet, soit la spore qui, elle, se colore beaucoup plus difficilement.

Méthodes de Coloration

Pour la coloration de la bactériodie, la méthode de Gram est utilisée journellement ; nous n'insisterons pas sur la technique qui est bien connue de tout le monde. Les bactériodies sont colorées en violet foncé et ses caractères morphologiques apparaissent assez bien, la gaine elle-même, non colorée ou très faiblement teintée par la safranine ou l'éosine, se distingue quelquefois d'une façon assez nette de la partie centrale protoplasmique fortement colorée. Mais la gaine est réellement mise en évidence, et, partant, le diagnostic plus sûr, quand on emploie certaines méthodes spécialement recommandées à cet effet. Telles sont celles de Johne, Klett, Olt et Rübiger.

Méthode de Johne. — Après avoir fait la préparation, on la sèche à l'air et on la fixe à la flamme. On colore avec une solution hydro-alcoolique de violet de gentiane à 2 % et on chauffe jusqu'à dégagement des premières vapeurs. On lave et on fait agir très rapidement une solution aqueuse d'acide acétique à 2 %. Lavage et ensuite dessiccation. Les bacilles sont colorés en violet et la gaine prend une légère teinte violette.

Méthode de Klett : a) Coloration simple. On fixe la préparation dans la flamme, on la colore rapidement par la fuschine ou violet de gentiane et on lave. Ensuite on recouvre la lame d'eau distillée et on chauffe jusqu'à dégagement des premières vapeurs; on répète cette opération dix à douze fois. Lavage et dessication.

b) Coloration double. On fixe toujours la préparation et on colore à chaud par le bleu de méthylène en solution hydro-alcoolique à 1 %. On opère encore ces dix ou douze lavages successifs avec l'eau distillée chaude. Pour faire apparaître la gaine par contraste, on colore rapidement avec la fuschine à 1 %. Lavage et dessication. La gaine est légèrement rose, contour plus foncé et la bactériodie apparaît bleue; cette méthode est à préférer dans le cas d'examen de parties cadavériques avariées, dit le Docteur Fiscoeder.

Méthode d'Olt : Coloration à chaud, pendant une ou deux minutes, avec la safranine à 2 %. Le protoplasme est rouge brun, la gaine est colorée en jaune, contour plus foncé.

Méthode de Rübiger : La préparation séchée à l'air est fixée et colorée rapidement avec une solution formolée de violet de gentiane. Lavage à l'eau et dessication. Les bactériodies sont colorées en violet foncé, la capsule en bleue avec contour bien marqué.

On s'est donc efforcé de découvrir des réactions colorantes spéciales à la bactériodie et permettant de la distinguer

de tous les bacilles qui envahissent le cadavre charbonneux. Avec le procédé de Gram, le diagnostic peut être fait, on peut le préciser d'ailleurs par les méthodes énoncées ci-dessus, mais ce ne sont pas là les seules employées : nous pouvons noter celles de Frank (éosine et bleu de méthylène), de Lüpke (violet de gentiane), de Giemsa (méthode de double coloration) et celle où on utilise les solutions polychromatiques, comme la thionine phéniquée, le bleu de Unna.

Dans toutes ces méthodes préconisées, il faut rapprocher celles de John Mac Fadyean, dont la technique est simple et susceptible de fournir des indications pratiques : on étale uniformément une couche mince sur une lame, soit une petite goutte de sang ou d'exsudat, ou un peu de pulpe d'un parenchyme suspect. On laisse sécher à l'air complètement, à l'abri des poussières. La lame est passée ensuite environ trois fois par sa face inférieure dans la flamme d'un bec Bunsen. On laisse refroidir et on étale sur la préparation une solution à 1 % de bleu de méthylène de Grüber, additionnée de 0,5 % de bicarbonate de soude (la préparation se fait à l'ébullition). Après quelques secondes de contact, on lave à l'eau. On sèche bien la préparation et on l'examine à l'immersion dans le baume de Canada. On l'examine à un grossissement de 800 à 1.000 diamètres et on voit, avec les bactériidies colorées en bleu, quelques leucocytes dont les noyaux ont une teinte vert bleu.

La particularité de la réaction consiste dans la présence,

entre les bacilles et autour d'eux, d'une matière amorphe, formant des amas ou de fines granulations violettes ou rouge pourpre. Le contraste avec la teinte des bactériidies est d'autant mieux apprécié qu'on examine la préparation avec un éclairage artificiel. Dans le cas où les bactériidies sont en amas, ces granulations violettes sont accumulées autour d'elles en abondance ; et les bacilles isolés sont également entourés par une enveloppe de même teinte.

On obtient cette réaction avec tous les produits virulents, sang, rate, exsudats divers, mais elle est surtout évidente avec le sang. Ce procédé est d'ailleurs applicable à toutes les espèces animales, sauf cependant avec le porc, chez qui le sang ne renferme qu'un nombre si faible de bactériidies qu'on ne les trouve pas par l'examen direct ; on peut les trouver cependant dans la pulpe des ganglions de la région pharyngienne. Chez tous les herbivores, la réaction existe aussi bien au moment de la mort que dans les cadavres complètement putréfiés, et cette teinte violette caractéristique apparaît parfois à l'œil nu, seulement par transparence. Mais ce qu'il y a vraiment de spécifique dans cette réaction, c'est que la matière amorphe violette ou rouge pourpre n'est décélée que dans le charbon, même quand les bacilles de la putréfaction pullulent dans le cadavre.

Pour que la coloration violette soit nette, il ne faut pas trop chauffer la lamelle ; au-dessus de 150°, elle n'apparaît pas ; 100° suffisent et il est même préférable d'être en-des-

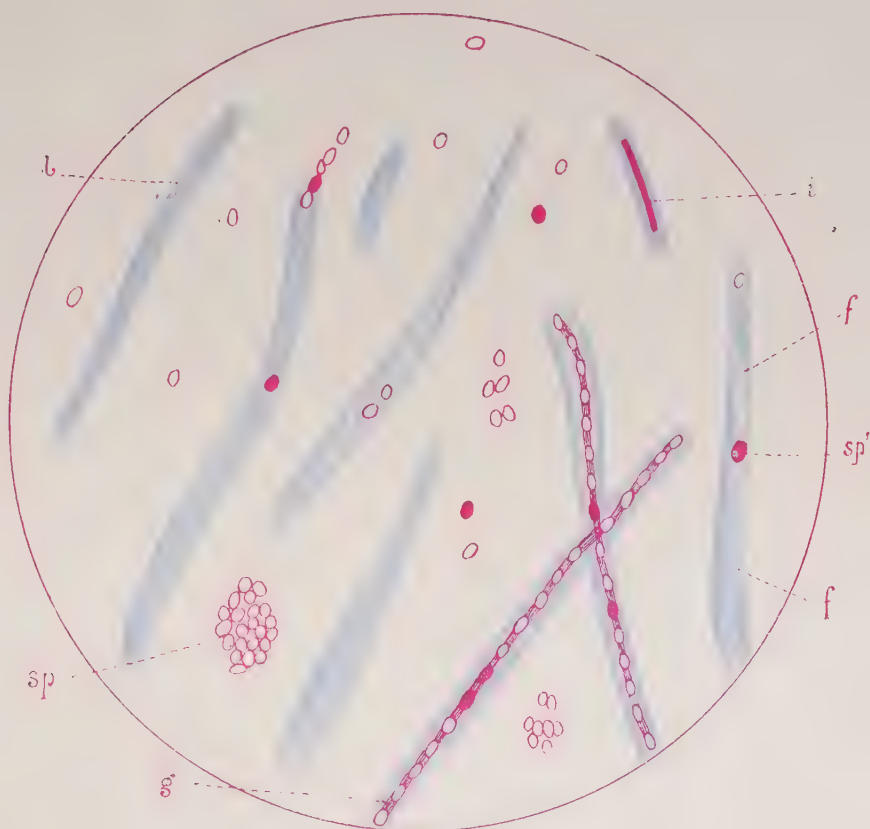
sous. De même, on ne voit pas apparaître cette caractéristique si les préparations sont préalablement fixées au formol, au sublimé, ou à l'acide osmique ; même chose si le sang est étalé en couche trop mince sur la lamelle. Ces conseils techniques sont donnés d'une façon précise par Mac Fadyean lui-même.

Pour l'examen du sang provenant des herbivores, il fait remarquer que celui de la grande circulation renferme toujours un grand nombre de bactériidies au moment de la mort. Une goutte de sang prise dans les veines superficielles permet également de déceler la bactériidie, même quand la putréfaction est commencée. Le diagnostic est presque toujours impossible si on prélève du sang dans les viscères.

A côté de toutes les méthodes de coloration que nous avons vues et qui, jusqu'ici, s'occupaient uniquement de la bactériidie, nous pouvons rapprocher une autre technique qui s'adresse à la spore. Nous avons déjà signalé que la spore est difficile à colorer ; elle l'est, en effet, par les méthodes ordinaires, mais elle devient plus facilement colorable cependant par la méthode de Möller, qui consiste en ceci : fixer deux minutes par l'alcool absolu, puis deux minutes par le chloroforme. Sans laver, on fait agir pendant dix minutes une solution d'acide chromique à 5 % ; laver à grand soin à l'eau courante. Colorer ensuite à chaud pendant cinq minutes par la fuschine de Ziehl jusqu'à émission des premières vapeurs ; laver. Renouveler trois ou quatre fois. Différencier par l'a-

cide sulfurique à 5 % ou par le chlorydrate d'aniline à 2 %, cinq secondes, puis par l'alcool absolu. Laver. Colorer les bactériidies par une solution de bleu de méthylène à 1 % ou par le bleu de Kühne à 1 pour 3. Laver, sécher. Les spores se monirent colorées en rouge et les bactériidies en bleu.

Coloration d'après le procédé de Bienstock : Pour colorer les spores sur les lamelles desséchées, on emploie le liquide d'Ehrlich chauffé, on lave à l'alcool, on passe la lamelle pendant une seconde dans le bleu de méthylène, on lave à l'alcool et on monte dans le baume. Par cette méthode, les bacilles sont colorés en bleu; les spores, libres ou contenues dans les bacilles, sont rouges; les spores en voie de formation restent ordinairement incolores. On y voit, colorés en bleu, des bacilles comme ils se présentent habituellement dans les cultures; il existe des parties colorées et non colorées. En suivant l'évolution des spores, elles se montrent d'abord comme de petits points colorés en rouge, qui s'agrandissent, deviennent ovales, acquièrent l'épaisseur du filament et dont le protoplasme ou la capsule seulement est coloré. Les spores sont parfois volumineuses et isolées, souvent elles se disposent en chapelet. Une forme bien étrange se rencontre parfois dans les cultures de charbon : ce sont de longs filaments qui présentent des espaces ronds et clairs, incolores, bordés à leurs points de contact par des croissants qui se colorent en rouge d'après la méthode de coloration des spores.



Spores et formes d'involution des bacilles observés dans une vieille culture sur agar-agar.

Coloration double avec fuschine et bleu de méthylène (Babès).

b. Bacilles en voie de formation.

f. Filaments montrant des parties colorées à côté de parties incolores.

sp. Spores en voie de formation.

sp'. Spores totalement colorées par le rouge d'Ehrlich.

i. Formes spéciales d'involution des bacilles.

g. Formes spéciales de filaments présentant des espaces ronds et clairs.

La seule identification de la bactéridie par ses caractères morphologiques mis en évidence par les colorants, n'offre pas, dans beaucoup de cas, une sûre garantie de l'existence du charbon bactérien, et il ne faudrait pas en attendre ce qu'on est en droit de supposer. Le diagnostic de la fièvre charbonneuse présente, en effet, de grosses difficultés pratiques, surtout lorsqu'on se contente d'un examen microscopique. Si des bactéridies pullulent dans le sang et dans tous les parenchymes des animaux morts de charbon, on sait qu'elles n'apparaissent que dans les douze ou quatorze heures qui précèdent la mort. Mais dans les formes subaiguës, leur multiplication n'a pas le temps de se produire et elles sont extrêmement rares dans le sang et les organes; elles peuvent même manquer dans la petite quantité de sang soumise à l'examen microscopique. Dans ce cas, la coloration nous donne un résultat négatif, alors qu'il sera positif par d'autres procédés de diagnostic, tel que le précipito-diagnostic.

Dès que les produits suspects sont envahis par d'autres germes, les caractères morphologiques de la bactéridie ne suffisent plus pour l'identifier avec certitude, surtout que par la putréfaction elle subit de grandes modifications. Quand les cadavres ont été éviscérés longtemps après la mort, la bactéridie est rapidement altérée, la substance chromatique se lyse, et en moins de vingt-quatre heures, quand la température est élevée, le protoplasme ne retient plus la matière colorante. Quant à la gaine, elle résiste mieux et on peut voir

dans le champ microscopique des gaines vides ou ne renfermant que quelques granulations.

Quand les autopsies sont tardives, la bactéridie a disparu; cependant, avec les méthodes de Klett et Olt, on peut mettre en évidence, deux ou trois jours après la mort, les capsules plus ou moins vides. Après ce délai, le microscope ne renseigne qu'imparfaitement, quoiqu'on ait encore trouvé des bactéridies huit à dix jours après la mort. Harnach, sur ce point, a fait remarquer que dans les cadavres de souris mortes de charbon, la colorabilité des gaines de la bactéridie, par les méthodes courantes, disparaît entre la 20^e et la 90^e heure qui suit la mort de l'animal.

Les gaines se colorent facilement au commencement de la période autolytique, puis elles perdent progressivement cette faculté au fur et à mesure que les saprophytes intestinaux envahissent l'organisme. La réaction de Mac Fadyean permet de caractériser la bactéridie dans le sang frais et dans le sang putréfié; elle persiste quarante-huit heures après la mort et même quatre-vingt-seize heures d'après Stockman, mais l'appréciation est difficile. Les méthodes qui mettent en évidence la gaine d'enveloppe donnent des indications pendant un délai beaucoup plus long après la mort que la réaction de Mac Fadyean, et cependant elles ont été reconnues bientôt insuffisantes. Il est nécessaire de se transporter dans le domaine de la pratique pour pouvoir s'en rendre compte : les diagnostics sont posés au laboratoire sur des matières

prélevées depuis quelque temps, ayant subi un emballage tout à fait précaire souvent, et la putréfaction de ces produits est complète quand on les examine; la bactériémie, si toutefois elle existe en assez grand nombre dans l'échantillon, peut être confondue très facilement avec tous les microbes pseudo-charbonneux et tous les microbes encapsulés qui lui ressemblent. Nous pouvons avoir encore d'autres causes d'erreur, plus graves celles-là, si nous ne nous en rapportons qu'à un diagnostic microscopique : des animaux plus ou moins résistants, plus ou moins immunisés contre le charbon ou inoculés avec des virus affaiblis, peuvent succomber en présentant des lésions semblables à celles du charbon sans que la recherche au microscope puisse révéler la présence de bactéries, soit dans le sang, soit dans la pulpe de la rate. Et même si nous voulons pousser plus loin, qui nous dit que certains animaux ne sont pas porteurs de germes ? Arndt a émis cette opinion et il a même constaté la présence possible de la bactérie dans l'intestin d'animaux sains. Ces animaux peuvent mourir d'une maladie tout autre que le charbon et, à l'examen microscopique du cadavre, une préparation malheureuse peut contenir la bactérie; diagnostic erroné par conséquent. Toutes ces remarques très justes nous poussent à admettre que dans les cas douteux, et nous devons le dire, beaucoup le sont, on ne doit pas s'en tenir au microscope; l'examen bactériologique doit être complété par des procédés de contrôle, inoculations, cultures, et autres investigations, car la maladie réclame un diagnostic certain.

Cultures

La culture, en dehors de l'organisme, permet de se rendre compte des conditions biologiques de ce microbe. Comme les champignons, la bactériodie vit aux dépens de matières organiques qu'elle décompose; elle se développe surtout dans les milieux neutres ou faiblement alcalins et pousse facilement sur tous les milieux de culture qu'on emploie d'une façon usuelle dans les laboratoires : bouillon de bœuf ou de veau, gélatine, gélose avec addition de peptone, sérum, lait, etc... La bactériodie se cultive dans tous ces milieux, mais elle possède un aspect caractéristique sur certains d'entre eux. Elle ne se développe normalement et abondamment qu'en présence d'oxygène; c'est un aérobie, mais qui se transforme progressivement en anaérobie facultatif. La température optimale est entre 30° et 40°, mais le développement s'opère de 15° à 43°; la sporulation n'est possible qu'entre 18° et 40°.

Dans le bouillon, au bout de vingt-quatre heures, elle se présente sous forme de flocons blancs ressemblant assez bien à des morceaux d'ouate nageant dans le liquide et qui, au microscope, apparaissent formés de filaments très longs, non ramifiés et emmêlés. Au bout de quelques jours, ces flocons

tombent au fond du vase en formant un dépôt poussiéreux, constitué surtout par des spores.

Les cultures sur gélatine, ensemencées par piqûre, présentent une végétation arborescente, blanchâtre, branchée perpendiculairement tout le long de la pointe d'inoculation et d'un aspect très spécial. La gélatine est lentement liquéfiée; vers le douzième ou quinzième jour, la liquéfaction est totale et de gros flocons blancs finissent par tomber au fond du tube. Sur les plaques de gélatine, en vingt-quatre heures, se développent des petites colonies arrondies qui, à un grossissement faible, apparaissent avec un centre obscur et la périphérie formée de longs filaments semblables à des touffes de cheveux.

La bactériidie pousse également bien sur les végétaux, les tranches de pommes de terre où elle forme un enduit blanchâtre, brunissant ensuite, et dans les infusions d'herbes, de foin, de racines. Soyka a pu la cultiver dans un mélange de quartz et d'eau stérilisée. Ces faits permettent de comprendre comment le microbe peut vivre en dehors des organismes animaux et justifient jusqu'à un certain point l'hypothèse de Koch qui considère la bactériidie comme un saprophyte accidentellement pathogène.

Sur le sérum, les colonies sont blanc mat, tournant au gris; quant au lait, il est coagulé vers le 3^e ou le 4^e jour; en ajoutant de la peptone il vire au jaune blanchâtre; vers le 8^e jour, le coagulum se redissout quand le lait est en tube.

Quant on reçoit des matières charbonneuses au Laboratoire, ce qui importe surtout, c'est d'établir rapidement un diagnostic pour en informer le plus tôt possible le praticien ; or, les cultures exigent un temps relativement long pour pousser ; ainsi, si nous partons d'un os à moelle, il faut compter environ vingt-quatre heures avant de l'examiner, et pour le sang, il faut de sept à huit heures à l'étuve. Pour pallier à cet inconvénient, Deno Gétor eut l'idée d'abréger la durée de cette diagnose à l'aide de la micro-méthode de Sierakowski qui est basée sur l'ensemencement sur une mince couche de gélose de 2 mm^3 d'épaisseur coulée sur lame. Cette lame est portée à l'étuve dans une petite cuvette de verre soigneusement fermée. Après quatre heures à 37° , on examine les cultures au microscope avec un faible grossissement. La culture de la bactériodie apparaît sous forme de filaments enchevêtrés. On examine de nouveau deux heures après, la culture prend un aspect caractéristique en tête de méduse. D'après lui, cette méthode diminue considérablement le temps de l'examen bactériologique. Elle exige cependant six heures, ce qui est encore appréciable.

La culture est un moyen complémentaire indispensable de l'examen direct et le procédé le plus rigoureux pour déceler la bactériodie, mais il ne peut être employé seul à l'exclusion des autres procédés de diagnostic expérimental. Le point délicat est le prélèvement des matériaux : quand on recueille les organes ou le sang aussitôt après la mort, on peut faire

les ensemencements; on obtient des cultures pures et, au microscope, leurs caractères permettent de poser un diagnostic certain. Mais dans les cas où l'on se trouve journellement au laboratoire, c'est-à-dire où les échantillons reçus sont putréfiés et fourmillent de microbes qui prêtent à confusion avec la bactériidie, les difficultés deviennent aussi grandes que pour l'examen direct du cadavre lui-même, surtout que les bactériidies ne résistent pas longtemps dans les matières prélevées septiquement. Nous-même nous avons pu remarquer, en faisant des ensemencements sur gélose, à partir d'une rate charbonneuse, que nous n'avons trouvé que du vibrion septique associé au bacille de la putréfaction.

A côté de la bactériidie se range un groupe de bacilles qui ont quelque analogie avec elle : c'est le groupe des pseudo-charbonneux ou bacilles anthracoides qui compliquent singulièrement, pour ne pas la rendre impossible quelquefois, la recherche microscopique de la bactériidie de Davaine. Parmi ces pseudo-charbonneux, on peut citer : le *Bacillus anthracoides*, isolé par Huppe et Wood, dans la terre et dans l'eau, qui ressemble étrangement par sa forme et ses cultures à la bactériidie; le *Bacillus sessilis*, découvert chez une vache suspecte de charbon; le *Bacillus pseudanthracis*, rencontré dans des farines d'Amérique; le *Bacillus pseudanthracis* de Kaesewurm, le *Bacillus anthracis simulans* de Wahrlich, le *Bacillus anthracis similis* de M'Farlaud, le *Bacillus apicum*, le *Bacillus leptosporus* de Klein, le *Bacillus mycoi-*

des, etc... Et d'autres encore ont été isolés de l'eau, du sang, des fécès, du lait de chèvre...

*
* *

Pour compléter ces données sur la biologie du bacille charbonneux, en dehors de l'organisme, nous passerons en revue l'action des agents physiques et chimiques. Nous savons que, quel que soit le milieu dans lequel il cultive, il a besoin d'oxygène libre; c'est un type de microbe aérobie; aussi l'absence d'oxygène le tue rapidement; c'est ce qui se produit dans les cadavres non ouverts et dans le sang conservé en tubes scellés, dans toutes les conditions où les spores n'ont pas pu se former.

Inversement, l'action prolongée de l'oxygène de l'air est un facteur d'atténuation de ses propriétés pathogènes, surtout si on fait intervenir la pression : on peut soit tuer les bacilles, soit les atténuer pour obtenir des races de virulence graduée; mais à n'importe quelle pression les spores restent inaltérées.

L'influence de la température est également de grande importance. La végétation du bacille se produit dans des limites assez étendues, entre 12° et 45°. Les spores se forment entre 10° et 40°; la température la plus favorable est de 35°; les spores se forment alors en vingt heures, tandis qu'il leur faut deux ou trois jours pour apparaître à 18° ou 20°; en dessous, la végétation cesse, mais le microbe reste toujours

vivant; il résiste même aux températures les plus basses: Von Frisch l'a constaté à moins 10°. Il est plus sensible à la chaleur car en milieu liquide il ne supporte guère plus de 50°; s'il est desséché, il vit encore plus d'une heure à 92°, d'après Momont, et se montre plus résistant dans le sang desséché que dans les cultures. Les spores ne sont tuées par l'ébullition qu'après plus de deux heures; quand elles sont desséchées, elles peuvent supporter une température de 120° à 130° (Pasteur et Joubert), alors que Massol pense qu'il suffit de 100° pendant dix minutes pour les tuer, même à sec. Les avis sont donc un peu partagés sur ce point.

Le Professeur Verge a fait une remarque bien intéressante; il stérilise une seringue et son aiguille, ayant servi à l'inoculation de culture charbonneuse, pendant dix minutes. Cinq jours plus tard, seconde stérilisation, puis cette seringue sert à inoculer deux cobayes avec un produit tuberculeux. Les deux cobayes meurent deux jours plus tard avec des lésions charbonneuses caractéristiques et la bactériodie est isolée du sang du cœur. Le Professeur Vallée eut l'occasion de faire cette même constatation. Cela prouve bien que la virulence n'est nullement atténuée par l'ébullition. Il est donc de toute première importance de stériliser d'une autre façon les instruments souillés, car l'ébullition à elle seule est une méthode condamnable.

La lumière est également néfaste à la végétation du bacille. Quant à l'action des diverses radiations, on ne peut en-

core se prononcer. Les rayons X paraissent entraver le développement des cultures. Danysz a trouvé aux émanations du radium une action bactéricide beaucoup plus énergique que celle des radiations.

Dans les milieux stérilisés au préalable, les spores peuvent vivre longtemps ; c'est ainsi que Sirèna a obtenu des cultures avec des spores conservées deux ans et dix-neuf jours dans l'eau distillée et stérilisée et avec des spores ayant séjourné plus de dix mois dans de la terre de jardin non stérilisée. Dans les couches profondes du sol, à l'abri de l'air et de la lumière, les spores se conservent longtemps. Quand les bacilles du charbon sont conservés dans des milieux non stérilisés, ils se trouvent en concurrence vitale avec d'autres microbes et, notamment, avec ceux de la putréfaction (Pasteur a reconnu que la putréfaction faisait disparaître la virulence du sang charbonneux). D'après Koch, quand les spores sont formées, elles résistent à la putréfaction, seulement lors de l'inoculation leur présence est masquée par l'action plus rapide des agents septiques. Certains microbes exercent une action nocive sur le développement de la bactériodie ; ces microbes, tels que le pyocyanique, le coli bacille, le microbe du choléra des poules, le bacille typhique, mélangés à des cultures bactériennes à doses convenables, neutralisent ses effets pathogènes. Le pyocyanique est antagoniste in vivo de la bactériodie de Davaine, ainsi que le streptocoque de l'érésipèle, le pneumo-bacille de Friedlaender ou leurs produits

solubles : cultures stérilisées de pneumo-bacille, toxines de la putréfaction. Les résultats varient même selon l'espèce animale et ceci est bien connu que les cultures stérilisées de bacillus prodigiosus entravent ou empêchent le développement du charbon chez le lapin et le favorisent chez le cobaye.

Dans l'action des antiseptiques on retrouve encore une grande différence entre la résistance des spores et celle des bacilles. Tandis que ceux-ci sont tués en quelques minutes dans le sublimé à 1/1.000, l'acide phénique à 5 %, les spores résistent plus de 20 minutes dans le sublimé à 1 % et dans le phénol à 5 % (Fraenkel). Il y en a même qui peuvent se conserver dans le phénol à 5 % pendant quarante jours : aussi emploie-t-on souvent les spores charbonneuses pour vérifier l'efficacité d'un désinfectant. Un fait curieux est à remarquer, quant à l'action du bichlorure de mercure sur les spores ; c'est Gæppert qui a attiré l'attention sur ce point ; un séjour relativement court dans la solution de sublimé les rend stériles, mais leur mort n'est qu'apparente, et si l'on précipite par le sulfure d'ammonium la petite quantité de mercure restée adhérente aux cellules, elles recouvrent leur vitalité et donnent des cultures. Signalons également un fait curieux relatif à l'atténuation de la résistance des spores et que deux auteurs, Staub et Forgeot, ont relaté : la spore devient inactive après 31 jours de contact avec l'alcool-éther ; mais si on l'attaque avec la liqueur de Schweitzer pendant une demi-heure seulement, elle se trouve tuée ensuite par un simple

contact de 24 heures avec l'alcool-éther. Les spores peuvent d'ailleurs se colorer parfaitement par la méthode de Möller dont nous avons parlé.

De son côté Schilling a obtenu également une atténuation des cultures de charbon avec certaines substances chimiques. Il a constaté que l'addition à de la gélose de 4 à 5 % de chlorure de sodium, de 1 % de ferrocyanure de potassium ou de 0,15 % de soude, n'empêche pas complètement la bactériologie de cultiver. Il arrive, par des repiquages successifs, à accoutumer la bactériologie; après une culture de sept semaines sur la gélose contenant 1 % de ferrocyanure de potassium ou 0,15 % de soude, la bactériologie est aussi pathogène pour le cobaye. Cultivée six semaines sur de la gélose contenant 5 % de chlorure de sodium, sa virulence est très atténuée pour le cobaye et le lapin. Il a même pu vacciner le lapin avec cette culture atténuée (0,5 cm³ de culture en sous-cutanée, et quatorze jours après 1 cm³ de la même culture), alors que pour le cobaye l'immunité n'a pas été constatée.

La chaleur associée à l'action des antiseptiques fait encore varier la résistance des spores; quelques chiffres donnés par Heider le montrent bien : ainsi, tandis que l'acide phénique à 5 % ne tue les spores qu'en 30 ou 40 jours, il ne lui faut plus que deux heures à 55° et de trois à quinze minutes à 57°. Pratiquement, pour la désinfection des objets, des locaux souillés, les agents les plus puissants sont, d'après Chamberland et Fernbach, l'eau de Javel, la solution de

chlorure de chaux au 1/10 et l'eau oxygénée qui, même à froid, détruisent les spores du charbon.

Parmi les liquides de l'organisme, le suc gastrique se comporte comme un véritable antiseptique vis-à-vis du bacille charbonneux qui est tué en une demi-heure, à la température de 38°; cette action paraît due à l'acide chlorydrique (Straus et Wurtz). Au contraire, le suc intestinal, le suc pancréatique sont de bons milieux de culture.

Prélèvement et conservation des produits suspects

Le matériel adressé au Laboratoire par les vétérinaires pour le diagnostic bactériologique arrive le plus souvent putréfié ou décomposé sous l'influence des microbes aérobies, anaérobies et de divers agents sporulés, comme nous l'avons déjà signalé, et la bactériémie s'y trouve détruite en vingt-quatre à quarante-huit heures. Nombre de bactériologistes se sont préoccupés, pour cette raison, de la question des produits à prélever et des moyens à utiliser pour les expédier au Laboratoire dans le but de rechercher la bactériémie. Le problème était de trouver un produit dans lequel, même longtemps après la mort, il soit facile de mettre en évidence l'agent de la maladie.

La dessiccation a été mise en valeur par Kaesewurm pour conserver les produits recueillis frais et les soustraire à l'influence de la putréfaction. Les produits virulents sont étalés sur une lame de verre, sur du carton et on imprègne des fils de laine ou de soie. Le sang de la jugulaire ou, mieux encore, le liquide d'hémorragie nasale, sont plus favorables. On recueillera du sang dans une veine très éloignée de l'ab-

domen, si le cadavre est dans un état de putréfaction très avancée. D'après Frey, une préparation bien faite séchée à l'air, en dehors de la lumière directe et de la chaleur, pourra servir pour la culture et l'examen; il préconise un petit morceau de gaze propre et stérile traitée comme la préparation, qui devient un excellent moyen d'envoi. Des résultats positifs ont été obtenus avec un échantillon ainsi préparé et conservé quatorze mois. Dans tous les cas, la dessiccation doit être faite rapidement; les bactériidies peuvent conserver leur vitalité dans le sang desséché pendant 36 à 50 jours; dans le sang en putréfaction et desséché ou dans du suc de tissus, pendant huit à vingt jours. Ces résultats ont été confirmés maintes fois. On peut rechercher directement la bactériдие dans le produit desséché, mis en suspension dans de l'eau physiologique, mais la culture est indispensable pour assurer le diagnostic et on l'obtient après ensemencement sur gélose liquide à 42° dans des boîtes de Roux.

Frey a trouvé un procédé plus pratique qui consiste à envoyer un morceau d'oreille coupée aux trois quarts de sa longueur, à partir de la pointe, et enveloppée dans du papier et du coton. L'oreille n'est envahie que tardivement par les bactéries de la putréfaction et, d'autre part, son cartilage résiste au processus de destruction.

Pour fournir les conditions nécessaires à la sporulation, Olt a recommandé l'envoi du sang charbonneux entre deux moitiés de pomme de terre lavée et cuite.

Un autre procédé en vigueur en Allemagne, dit procédé strasbourgeois, étudié par Forster, puis par Jacobsthal et Pfersdorff, utilisé pour la récolte et le transport dans de bonnes conditions de produits recueillis sur les animaux morts de diverses maladies contagieuses et appliqué au charbon bactérien, fournit aux germes, aussi rapidement que possible, les meilleures conditions de sporulation. La solution était facile, en raison de la formation des spores et de leur résistance; il s'agissait de se procurer un produit solide facile à transporter. Les travaux de ces trois auteurs ont montré que le sang charbonneux même putréfié, étalé en couche mince sur des plaquettes de plâtre imbibées de bouillon, donne des spores en un temps plus court que dans le bouillon sur l'agar ou la pomme de terre; dans ces milieux, la sporulation se fait en 34 à 36 heures à 24°; ou en 14 à 16 heures à 37°, tandis que les cultures réalisées sur plaquettes de plâtre sont sporulées en 22 heures à 24° et seulement en 8 à 9 heures à 37°.

Par ce procédé de Forster, les bacilles anaérobies sont détruits, de même les microbes du groupe *Bacillus subtilis* et du *Bacillus* de la pomme de terre, qui ne poussent pas sur les plaquettes de plâtre à 18°-20°. Les bacillus tels que le coli, le fluorescens, le proteus qui sont toujours présents dans le matériel d'ensemencement ne sont pas détruits, mais sont toujours beaucoup moins nombreux que dans les cultures ordinaires. Pour les détruire, il suffit de chauffer le bouil-

lon ensemencé une ou deux minutes à 62° ; cette température ne détruit pas les formes végétatives de la bactériidie charbonneuse ; il faut pour cela un chauffage de 5 minutes à 65°.

Les baguettes de plâtre utilisées et recommandées par Jacobsthal ont de 12 à 14 cm. de long, sur 1 cm. 5 de section carrée ; elles sont préparées d'abord au Laboratoire ; on les imbibe à saturation de bouillon de Löffler, on dessèche et on les expédie dans un tube à paroi épaisse et bien emballé. Le vétérinaire recueille le sang d'une veine superficielle ou de la coupe d'un tissu, l'étale en couche mince sur cette baguette et la retourne au laboratoire dans les mêmes conditions d'emballage à cause de sa grande fragilité. A l'arrivée, on opère le râclage de la baguette et on broye ce produit avec du bouillon de Löffler ; on peut le conserver dans l'étuve à 18°-22°. Le tube de bouillon qu'on ensemence est chauffé pendant deux minutes à 65° pour détruire le coli et le proteus, puis on le refroidit brusquement. La dilution sert à ensemencer, avec une seule prise de liquide, trois tubes de gélose pour l'isolement. Les colonies obtenues sont identifiées par l'examen direct, par les préparations colorées et par les inoculations. Si ce premier examen ne donne rien, on reprend alors le produit de râclage conservé à 18°-22° dans l'étuve, on recommence l'ensemencement dans du bouillon, mais cette fois il faut chauffer dix minutes à 65° pour détruire les autres germes. L'examen est le même que dans le premier cas. Cette méthode, utilisée depuis 1903 à l'Institut d'Hygiène et

de Bactériologie de Strasbourg, a donné les meilleurs résultats; dans 32 % des cas où l'examen microscopique était négatif ou douteux, les recherches sur la baguette ont donné un résultat positif; le nombre de cas de charbon, en Allemagne, que ce procédé a permis de reconnaître, est monté à cette époque-là de 280 à 377 cas.

L'inconvénient de l'emploi de la baguette est sa grande fragilité ainsi que sa préparation et sa stérilisation préalables au Laboratoire; aussi, Eberlé et Schüller ont-ils proposé de la remplacer par des morceaux de carton ou de petits rouleaux de papier filtre; de même que Reinecke recommande d'employer un fragment de brique, très facile à se procurer en clientèle et qu'on expédie dans un flacon à large goulot. Müller et Engler ont cherché, parmi les substances poreuses, celles qui convenaient le mieux pour la sporulation et ils ont expérimenté avec la terre cuite et la craie. La craie absorbe une grande quantité de sang suspect et donne sur la gélose un nombre plus grand de colonies que la terre cuite imbibée des mêmes produits; mais la craie devient friable par suite de l'absorption d'humidité et se réduit en morceaux. C'est pourquoi ils en reviennent à employer un petit fragment de pot à fleurs qui est stérilisé dans l'eau bouillante et refroidi dans de l'eau bien fraîche. On enduit la face rugueuse d'une couche épaisse de sang qui servira à rechercher les bactéries; sur la face lisse on étale du sang en,

couche mince pour favoriser la sporulation. Le fragment est alors envoyé au Laboratoire.

Un autre auteur, Bozelli, a eu l'idée, pour servir de support au sang suspect, de se servir d'une plante de la famille des ombellifères, *Ferula communis*, qui, grâce à la porosité des fibres de sa tige, absorbe facilement les liquides. On coupe en deux longitudinalement une tige bien sèche et on enduit ses surfaces poreuses avec le matériel; quand le tout est sec, on applique l'une sur l'autre les deux surfaces, on fait une ligature et on envoie au Laboratoire. Le sang se conserve très bien de cette façon pendant quelque temps, du sang recueilli, même dix heures après la mort, a cultivé et est resté encore virulent pour le cobaye après quinze jours de conservation.

Nous signalerons également un moyen de conservation proposé par P. Totirè-Ippoliti : on inclut un morceau d'organe frais dans la paraffine. Les produits charbonneux s'y conservent à peu près sans altération pendant plus de quinze jours, temps suffisant pour faire un diagnostic. Même après plus d'une année de conservation, ces produits se sont montrés notablement modifiés dans leur virulence, mais ils ont pu servir néanmoins pour la réaction d'Ascoli.

Somme toute, ces procédés aussi ingénieux qu'ils soient, qui même ont joui d'une assez grande faveur à leur époque, n'en restent pas moins inutilisés à l'heure actuelle; il ne nous paraît pas d'ailleurs qu'ils soient d'un bon emploi dans la

pratique courante. Avant tout, il faut envoyer au Laboratoire des produits qui doivent se conserver pendant le transport et dont la manipulation soit simple.

En 1909, deux auteurs roumains, Cuica et Stoicesco, démontrant que la peau et les poils des sujets infectés de charbon recèlent les spores bactériennes, ont examiné méthodiquement les cadavres putréfiés pour voir si l'examen bactériologique de la peau ne pourrait pas constituer un moyen sûr de diagnostic du charbon (La technique de Frey, envisagée plus haut, qui consiste à envoyer un morceau d'oreille, s'inspire de cette constatation). Les morceaux de peau prélevés sur les cadavres sont mis à sécher et sont ensuite raclés avec un scalpel; les produits obtenus sont délayés et triturés avec une solution physiologique dans un mortier; cette émulsion sert à ensemercer des tubes de bouillon qu'on chauffe à 65° pendant une demi-heure pour détruire toutes les bactéries qui y végètent; il ne reste plus que les spores charbonneuses et celles d'autres microbes. On ensemece dans la gélose liquide, maintenue à 45°, on agite fortement et on transvase dans les boîtes de Pétri qu'on laisse à l'étuve à 37° ou 38° pendant vingt-quatre heures. Diverses colonies se sont constituées dans lesquelles on trouve du charbon, du subtilis, des anaérobies. On étudie ensuite la culture charbonneuse par repiquage sur divers milieux. Ces auteurs ont fait de nombreuses expériences et tous les résultats de l'examen bactériologique de la peau ont été positifs, même qua-

torze mois après la mort, alors que l'examen avec les organes ou le sang donnait un résultat négatif. Les peaux se trouvent souvent souillées par les spores charbonneuses, surtout en ce qui concerne les peaux exotiques; les peaux et poils importés du Japon proviennent surtout de Chine : la proportion des peaux charbonneuses a varié de 4,3 % en 1924, à 11,1 % en 1925 (250 examens environ ont été faits chaque année). Pour les poils, la proportion de 9,4 % en 1924 a été inférieure à 1 % en 1925.

Il n'est pas contestable que la présence de ces spores dans les peaux d'importation venant d'Orient ou du Maroc soit la source de certains cas de charbon rencontrés chez les ouvriers des tanneries; on a même établi que le travail des soies de porc dans les fabriques de brosses et de pinceaux pouvait être la cause de cette maladie. De 1899 à 1904, Legge a relevé 261 cas de charbon parmi les ouvriers en laine, crins, cuirs et peaux. Les laines sont dangereuses aussi, en raison de leur origine exotique : celles venant de Perse et de l'Inde le sont plus particulièrement; pour les peaux, celles provenant de Chine, de Bombay. Parmi les ouvriers atteints de pustule maligne, ceux dont la tâche est de porter les peaux sur l'épaule sont atteints au cou le plus souvent; mais la tête est la région la plus fréquemment atteinte. De même, on a signalé de nombreux cas de charbon dans les Hôpitaux de Hambourg, chez les ouvriers du port qui ma-

nipulent les ballots de marchandises enveloppées dans des peaux.

Une femme qui travaillait au tamisage de certaines plantes, dans une droguerie, contracta la maladie par inhalation de poussières; les plantes utilisées venaient d'Argentine et étaient enveloppées de peaux provenant d'animaux charbonneux.

Un homme exerçant le métier de corroyeur présente, à son entrée à l'hôpital dans le service des érysipélateux, de l'œdème considérable des paupières, de la joue, des régions temporales et frontales droites, œdème causé par une piqure de mouche. La mort survint deux jours après. Sur les frottis de la sérosité et dans la culture, on ne trouve que des cocci; mais en pratiquant l'hémoculture, on se trouve en présence de la bactériidie de Davaine.

Nous pouvons nous demander si la septicémie charbonneuse chez l'homme est aussi rare qu'on veut bien le dire, du fait qu'on ne pratiquait pas assez souvent les hémocultures.

Une épizootie de charbon au Maroc nous fournit encore un exemple de la transmission de la maladie par les peaux infectées : un taureau malade ayant été sacrifié, sa peau servit à faire une « guerba » pour puiser de l'eau dans les puits. Cette eau donnée aux animaux de deux douars provoqua une mortalité dépassant 30 % de l'effectif. Il a suffi de détruire

la guerba, de désinfecter les puits et de faire la vaccination pour arrêter l'épidémie.

Il est à remarquer, et nous nous empressons de le dire, que ces accidents causés chez l'homme par la manipulation des peaux ou cuirs sont très rares à l'heure actuelle, car la prophylaxie consiste aussi en des règles d'hygiène industrielle en dehors des mesures sanitaires appliquées aux animaux et à leurs cadavres. Aujourd'hui, le traitement des peaux exotiques par les antiseptiques, sans détérioration aucune de ces dernières, a donné les meilleurs résultats (acide formique, sublimé, acide chlorydrique, etc...) et la destruction des spores a été contrôlée par l'inoculation.

*
* *

Revenons, après cette digression, aux procédés encore employés pour adresser au Laboratoire les produits suspects, et parlons de celui que Wülff a préconisé en Allemagne, en 1912, après la mise en vigueur de la loi du 25 juillet 1911, qui prévoit l'obligation d'un examen bactériologique dans tous les cas de charbon. Le procédé consiste essentiellement à utiliser la propriété que possède la bactérie charbonneuse de se conserver dans la moelle osseuse des animaux morts de charbon.

Wülff a fait des expériences sur divers os préalablement enfouis, et il a pu trouver la bactériodie dans la moelle osseuse

quelques semaines (29 jours) après la mort de l'animal, alors que l'examen pratiqué à cette époque sur le foie, les muscles, le cœur, les poumons, a été négatif. Sur des échantillons provenant de cas suspects de charbon chez le bœuf et le porc, il a trouvé la bactériémie dans la moelle des os longs, il l'a trouvée également dans l'os iliaque. Il est un fait établi que les bacilles résistent très longtemps à la putréfaction dans la moelle parce qu'elle est protégée contre le milieu extérieur, et son examen donne des résultats incontestables quand le sang et la rate ne peuvent plus être employés pour le diagnostic (putréfaction). Wülff recommande d'envoyer au Laboratoire un métacarpien ou un métatarsien, alors qu'un os spongieux, tel qu'une phalange, est moins propre à la conservation, parce que très vascularisé et plus poreux.

Un auteur italien, Sani, vient confirmer la valeur de la méthode de Wülff qu'il recommande très spécialement. « La composition chimique du tissu osseux et sa compacité, dit-il, opposent certainement une grande résistance à la putréfaction des os; de sorte que la fermentation anaérobie ne se fait sentir que tardivement sur les bacilles charbonneux dans la moelle osseuse. »

Cette étude a d'ailleurs été reprise par Marchisotti, en Argentine, où la température est assez élevée, et il a trouvé la bactériémie dans un os de mouton huit à dix jours après la mort. Sur 94 analyses qu'il fit, il obtint 55 résultats positifs, 25 négatifs, soit 85 % de résultats nets et 15 % de résultats

douteux. Pour l'envoi au Laboratoire, il recommande d'enlever la peau d'un membre et de désarticuler un gros os à ses deux extrémités, un métacarpien par exemple. D'après Sani, cette méthode devrait être adoptée de préférence à toutes les autres dans le cas où le diagnostic doit être établi sur des cadavres en état de putréfaction avancée.

La valeur du procédé est indiscutable, tant au point de vue des résultats obtenus que des conditions d'envoi : l'os étant enrobé dans un peu de son et enveloppé dans une toile épaisse. Au préalable, il nous paraîtrait indiqué de ruginer l'os tout au moins dans la partie environnant le trou nourricier car, pendant les fortes chaleurs, le tissu conjonctif qui peut rester adhérent est souillé par des microbes de toutes sortes et il se forme une culture autour de l'os; ces germes peuvent pénétrer par ce trou et aller pulluler dans son intérieur, ce qui peut fausser les résultats de l'examen de la moelle osseuse.

Non seulement pour le charbon, mais pour d'autres infections microbiennes, des recherches postérieures ont montré l'intérêt pratique de ce procédé. Ainsi Truche l'a employé avec succès dans la typhose aviaire; Staub pour le choléra aviaire (on a trouvé la bactérie ovoïde dans la moelle osseuse d'une poule en putréfaction depuis 60 à 70 jours); Giovine s'en sert pour le diagnostic du rouget du porc.

Malgré toute la valeur scientifique qu'on peut conférer à une méthode, quels que soient ses avantages, il est un fait bien établi qu'elle demande un temps plus ou moins long pour être admise dans le domaine de la pratique; la routine est un mal qu'on rencontre jusque dans la vie scientifique. Nous avons pu constater souvent au Laboratoire des recherches d'Alfort que peu de praticiens encore utilisent le procédé de Wülff, et pour ne pas dire toujours, les recherches doivent se faire sur un matériel composé de sang ou de fragments de rate le plus souvent putréfiés. L'emballage est toujours très défectueux : petites boîtes en carton ou tubes de verre plus ou moins bien bouchés, le tout entouré de papier de journal, si bien que la souillure du paquet est réalisée à souhait. La manipulation peut être très dangereuse et c'est avec des pincès qu'il faut aller à la recherche de l'échantillon. Une circulaire du Ministre de l'Intérieur en date du 2 février 1912 précise pourtant les conditions auxquelles doit se soumettre l'expéditeur par la poste de produits destinés à un examen bactériologique. Nous plaçant donc dans la pratique, puisqu'il est impossible de nier l'évidence des faits, nous nous sommes proposé, dans la mesure du possible, d'attirer l'attention sur le rôle que peuvent jouer quelques antiseptiques ajoutés aux produits charbonneux destinés à être envoyés au Laboratoire. Ces antiseptiques, additionnés soit à du sang, soit à la pulpe splénique, et à des doses convenables que nous avons déterminées, auraient pour but de

rendre l'envoi stérile puisque la bactéridie, de ce fait, se trouve altérée. De plus, puisque la bactéridie est recueillie dans l'organisme avec le sang ou l'organe prélevé, elle n'est pas sporulée (absence d'oxygène), et aucune spore ne pourra se former pendant la durée du transport du matériel suspect puisque l'antiseptique n'est pas un milieu propice à la formation de ces spores; donc, aucune chance de souillure ou de contagion de la part de cet agent éminemment résistant et dangereux.

De plus, l'organe arrivera au Laboratoire dans l'état où il était au moment de l'expédition, sans aucune autre altération; il va sans dire qu'aucune putréfaction, ni autre fermentation, ne se seront produites; tous les germes qui entravent singulièrement la recherche bactériologique auront trouvé un milieu non favorable à leur développement et seront tués, s'il y en a. La bactéridie, quoique altérée, peut être décelée cependant par les méthodes de coloration habituelles, la gaine est encore visible; mais pour faire le diagnostic à l'aide du microscope, nous nous heurtons aux mêmes difficultés déjà signalées, plus grandes encore dirions-nous, puisqu'il nous est impossible de faire, soit des cultures, soit des inoculations avec le matériel ainsi préparé.

Nous avons fort heureusement à notre disposition, au Laboratoire, une méthode de diagnostic de tout premier ordre, dont nous allons parler maintenant et pour laquelle nous avons employé ces produits conservés par les antiseptiques;

ils nous ont donné entière satisfaction, tant au point de vue de la manipulation, devenue plus agréable, que de la précision dans les résultats de cette méthode.

Nous abordons ici le procédé de diagnostic de la fièvre charbonneuse auquel on doit donner la plus grande valeur, grâce à la certitude de ses indications et à sa rapidité d'exécution : le procédé d'Ascoli Valenti.

De nombreux travaux faits dans de différents pays ont confirmé sa réelle supériorité sur les méthodes de Laboratoire que nous avons vues jusque-là, où le bactériologiste néglige complètement la recherche des constituants bacillaires provenant de la lyse de la bactérie. Ce sont les procédés sérodiagnostics seuls qui permettent de rechercher ces substances spéciales, lesquelles sont d'autant mieux mises en évidence que les matériels charbonneux sont plus altérés parce qu'elles doivent s'y trouver en plus grande abondance. Les produits de décomposition de la bactérie dans les cadavres contiennent une substance précipitogène qui provoque, en présence de certains sérums anti, un précipité spécifique; la réaction est très sensible. Nous disons certains sérums, parce que la préparation des précipitines anti-charbonneuses est très délicate; Ascoli s'est aperçu qu'en immunisant plusieurs animaux avec les mêmes cultures et les mêmes doses, les sérums obtenus n'avaient pas la même valeur; certains donnaient de très bonnes précipitines, d'autres en fournissaient de médiocres et même d'inactives; longtemps Ascoli a pos-

sédé seul un sérum actif, tandis que les sérums de Bürow, de Sobernheim ne donnaient pas de réaction. Bierbaum constate également que la réaction est obtenue seulement avec le sérum d'Ascoli.

La précipitine ou anticorps contenue dans le sérum précipitant (âne hyperimmunisé par exemple) donne au contact de l'extrait charbonneux ou antigène une réaction zonale presque instantanée qui se traduit par un anneau blanchâtre, nuageux, caractéristique, apparaissant à la surface de séparation des deux liquides superposés (sérum plus dense). La réaction d'Ascoli est absolument spécifique de l'affection charbonneuses : des expériences faites avec le sérum normal et avec d'autres sérums (diphthérie, dysenterie) ont donné des résultats négatifs, alors qu'elle décèle la présence de l'antigène dans tous les organes, dans le sang, dans l'œdème, dans les épanchements des animaux atteints, quel que soit l'état de conservation de ces produits. La putréfaction ne nuit aucunement à la réaction de précipitation qui est positive, même avec des extraits d'organes putréfiés depuis plus de seize mois ; c'est là le très gros avantage de la méthode.

Pour que l'épreuve ait toutes les chances de succès, il est indispensable d'opérer avec un sérum doué d'un pouvoir précipitant marqué ; cette qualité existe quand l'anneau blanchâtre apparaît au moment même du contact du sérum avec l'extrait charbonneux. Ce pouvoir précipitant ne paraît pas se

modifier par l'action prolongée du froid : Schütz et Pfeiler se servent d'un sérum conservé à la glacière pendant trois ans et sa qualité reste toujours la même ; de même, ils utilisent avec succès un sérum vieux de deux ans et additionné de phénol. Pendant longtemps on n'employa que le sérum dont se servait Ascoli, le seul qui permettait d'obtenir des résultats certains. Depuis, nous possédons un sérum spécifique délivré par l'Institut Pasteur, grâce auquel la séro-précipitation devient un procédé courant de diagnostic de la fièvre charbonneuse.

Les extraits charbonneux employés sont préparés de différentes façons, soit par ébullition, soit par émulsion directe à froid, soit par émulsion à froid après épuration au moyen de chloroforme. Ascoli préconise l'extrait par ébullition, qui consiste à délayer un peu de matériel suspect dans de l'eau physiologique, à chauffer jusqu'à ébullition prolongée et filtrer sur papier ; le liquide clair obtenu contient les thermo-précipitines, ainsi appelées parce qu'un chauffage à 60° ou 100° ne les altère pas. Le sérum, s'il a besoin d'être clarifié, est filtré sans chauffage sur amiante ou sur une bougie et à la rigueur peut être centrifugé. Ascoli, pour rendre la recherche plus facile, a imaginé un appareil spécial : c'est un tube à essai rempli de sérum physiologique dans lequel on met quelques grammes de matériel suspect ; ce tube est plongé pendant quelques minutes dans l'eau bouillante. Après refroidissement, on verse cet extrait dans un petit en-

tonnoir dont le tube effilé arrive juste au contact du sérum contenu dans un autre tube. L'extrait se superpose ainsi doucement au sérum et l'anneau se forme aussitôt avec grande netteté.

Nous avons employé la technique, conseillée par M. Rindjard, qui est la suivante : « On additionne les produits suspects (rate, foie, etc...) finement broyés dans un mortier, de quatre à cinq fois leur poids d'eau physiologique et on fait bouillir cinq minutes; on filtre à froid sur papier deux ou trois fois jusqu'à ce que le liquide devienne clair. Dans un petit tube à essai de 3 à 4 ^m/_m de diamètre, on verse 0 cm³, 5 de sérum précipitant puis, avec un pipette à effilure très fine, on ajoute dans ce même tube 0 cm³, 5 du filtrat précédent, en prenant la précaution d'appliquer l'extrémité de la pipette contre la paroi du tube qu'on incline très fortement pour que les liquides restent superposés. »

Cette technique est employée d'une façon courante au Laboratoire des Recherches à Alfort; elle donne toute satisfaction quant à ses résultats et quant à sa rapidité d'exécution.

Bessemans et Leynen, en Belgique, dans leurs nombreuses analyses, ont eu recours à l'extrait par ébullition et au sérum venant de l'Institut sérothérapique de Milan; ils contrôlaient chaque réaction par la méthode bactériologique et jamais ils n'ont trouvé le procédé d'Ascoli en défaut.

Profé montre que les résultats sont plus favorables avec

les organes soumis à une longue ébullition qu'avec ceux soumis à un chauffage rapide.

D'autres auteurs, au contraire, donnent la préférence à l'extrait préparé à froid, simple ou chloroformé; c'est ainsi que Schütz et Pfeiler emploient l'extrait épuré au chloroforme, qui leur fournit des indications plus certaines que les extraits obtenus par cuisson. Ils recommandent, ainsi que Profé, de broyer l'organe avec du sable, de l'agiter dix minutes avec du chloroforme, de faire un extrait par décantation du chloroforme et d'extraire celui-ci dans de l'eau physiologique maintenue au bain-marie à 50° pendant une demi-heure à une heure. Ces deux auteurs considèrent cette méthode de précipitation comme la plus sûre; elle leur a permis de constater chez le bœuf vingt-deux cas de charbon qui avaient échappé aux méthodes de la bactériologie; même les inoculations à des souris n'ont décelé que 87 cas sur 110, alors que la méthode d'Ascoli seule leur en a révélé 109. Chez le cheval, chez le mouton, chez la chèvre, la méthode offre la même exactitude; même chez le porc, où les bactéries sont rares, en faisant des extraits au chloroforme avec des portions d'intestins qui sont tuméfiées, hémorragiques, l'Ascoli n'est pas défaillant, quoique Osiander ait signalé le contraire....

Cernaianu également, en Roumanie, se sert depuis quelques années d'un extrait phéniqué préparé à froid, s'inspirant des recherches de Francke, Standfuss et Schnauder qui

procèdent ainsi : ils mettent un gramme du produit de râclage de la peau dans 4 à 5 cm³ d'eau physiologique phéniquée à 0,5 % et ils laissent en contact seize heures à la glacière; l'extrait est très clair et garde sa limpidité pendant très longtemps, les germes ne pouvant y cultiver. Cernaianu se sert de ce procédé pour le diagnostic des peaux et organes charbonneux, afin d'éviter le chauffage qui demande un temps plus long; les résultats sont identiques à ceux fournis par les thermo-précipitines.

Nous en arrivons aux conditions que doit remplir l'extrait pour que la réaction ait le plus grand rendement; d'après Bessemans et Leynen, c'est une filtration parfaite et une forte concentration. Si l'extrait n'est pas suffisamment clair, il peut se former un anneau louche, pouvant prêter à confusion, quoiqu'il soit toujours moins opaque que celui de la réaction positive. A cet effet, Ascoli, dans le but de précipiter l'hémoglobine qui se trouverait dans l'extrait et le rendrait trouble, émulsionne au préalable le broyage de l'organe avec du chloroforme avant d'en faire l'extraction avec la solution physiologique. Il a proposé également l'addition d'acide acétique pour éclaircir les extraits; Schütz et Pfeiler ont trouvé préférable d'ajouter au liquide du charbon de bois pulvérisé et d'agiter le tout; mais le gros inconvénient est que l'action prolongée fait disparaître le précipitogène dans l'extrait.

D'une façon générale, pour avoir un liquide clair, nous

avons constaté qu'il suffisait de laisser bouillir l'organe pendant dix minutes environ; toutes les albuminoïdes se trouvent coagulées, la matière a perdu sa coloration sui generis et le liquide, après deux ou trois filtrations sur papier ou sur amiante, a une limpidité parfaite. De cette façon nous n'avons jamais obtenu de réaction douteuse en ce qui concerne la netteté de l'anneau.

L'extrait doit être également aussi concentré que possible, quoiqu'on ne puisse pas dépasser une certaine limite; les deux auteurs belges ont constaté que s'il est dilué au demi et surtout au quart, la réaction ne se produit plus. Des auteurs américains, cependant, ont obtenu, à partir de cultures charbonneuses, après une préparation très complexe, un « résiduel antigène » qui, avec le sérum, donnait un précipité deux heures après. Ils ont eu des réactions de précipitation avec cet antigène spécial et des sérums anti-charbonneux jusqu'à la dilution de 1 pour 500.000. Somme toute, il suffit d'avoir un extrait assez clair et de concentration normale, pour obtenir une bonne réaction; d'ailleurs il est toujours bon de faire un ou deux essais de contrôle.

La réaction d'Ascoli est, sans contredit, la méthode la plus rapide, la plus sûre et la plus simple. Roncaglio, Lèbre et d'autres l'ont affirmé. Fiscoeder qui, tout d'abord, avait enregistré une proportion élevée d'insuccès obtint par la suite des résultats très favorables (100 %) en changeant de sérum précipitant. Sans doute, les défaillances de la méthode sont

liées à l'usage d'un sérum anti-charbonneux trop pauvre en précipitines, car les différents sérums précipitent avec une intensité variable. Si le sérum est pauvre, il est à conseiller d'utiliser le procédé préconisé par le Professeur Vallée pour la concentration des anticorps coagulant les sérums. « Le sérum est jeté goutte à goutte dans dix fois son volume d'eau distillée saturée d'acide carbonique. Les globulines précipitent, entraînant avec elles les précipitines. Le précipité est redissous dans un volume de sérum physiologique, dix ou cinquante ou cent fois inférieur au volume du sérum précipité; il en résulte un anticorps qui est dix à cent fois plus actif que le sérum primitif. »

Partiement, il suffit d'employer un sérum que l'on a essayé auparavant et qui donne un précipité net et instantané.

La réaction est spécifique; tous les organes d'animaux ayant succombé au charbon contiennent des substances précipitogènes; la rate, le sang, la peau, les muscles, l'intestin, le cœur, le foie, le poumon, les excréments même, donnent le précipité quel que soit leur état de conservation. Fleming a obtenu des résultats tout aussi nets avec une rate putréfiée depuis vingt-deux jours qu'avec le tissu frais. Il arrive que la réaction semble positive avec des extraits concentrés de bacilles ressemblant au bacille du charbon (anthracoïdes), mais en diluant l'extrait au 1/20°, la réaction devient négative.

tive, alors qu'avec l'anthraxis la réaction est positive, même au 1/100° (Pfeiler et Drescher).

Nous signalerons que le sel et la cuisson n'ont aucune action sur le précipitogène et que la méthode d'Ascoli peut servir à l'examen des viandes de conserve (saucisson par exemple). Elle aidera également à la recherche du charbon dans les peaux importées ayant subi ou non une préparation : salaison ou dessiccation.

*
**

C'est donc en vue de la réaction d'Ascoli, qui suffit à elle seule pour poser le diagnostic du charbon bactérien, que nous avons pensé additionner d'antiseptiques les produits suspects. Afin de nous rendre compte des modifications que pourraient faire subir ces antiseptiques au sérum anti-charbonneux dans sa composition physique, nous avons expérimenté d'abord sur du sérum normal de cheval, dans un but purement économique. Nous avons déterminé d'une façon assez précise les taux de solution antiseptique qui n'altèrent pas le sérum normal au bout d'un certain temps. L'antiseptique, au contact du sérum normal (par superposition) provoque, en effet, un anneau opaque plus ou moins flou dû à la coagulation des matières albuminoïdes. C'est la formation de cet anneau qu'il s'agit de retarder, pour laisser un temps suffisant à l'apparition de la vraie réaction zonale d'Ascoli, lorsque nous expérimenterons avec le sérum précipitant.

Nous avons opéré avec le formol, l'acide phénique et le fluorure de sodium. Dans une série de petits tubes à essai nous avons versé d'abord le sérum normal (2 cm³) puis la solution antiseptique (2 cm³), en ayant soin de faire la superposition, et pour cela nous nous sommes servi, comme pour l'Ascoli, d'une pipette très effilée.

Nous avons résumé nos expériences en des tableaux où figurent horizontalement les différents taux des solutions employées et, verticalement, le temps au bout duquel, plus ou moins tardivement, se constatent les modifications que présente le sérum normal.

Les solutions d'antiseptiques sont faites dans du sérum physiologique.

Voici les résultats obtenus :

I. — Solution de formol

CONCENTRATIONS	10 %	5 %	2 %	1 %
1 heure après mélange	pas de modification rien	rien	rien	rien
4 heures après	rien	rien	rien	rien
5 heures après	rien	léger trouble zone blanchâtre à la séparation	léger trouble	rien
6 heures après	anneau très net	anneau flou	zone blanchâtre	rien
le lendemain matin	anneau à précipité Sérum louche	anneau à précipité Sérum louche	zone blanchâtre	rien
2 jours après	id.	id.	id.	id.

II. — Solution d'acide phénique

CONCENTRATIONS	10 %	5 %	2 %	1 %	5 %
10 minutes après	précipité abondant Sérum coagulé	précipité abondant Sérum coagulé	zone blanchâtre	rien	rien
1 heure après	id.	id.	id.	rien	rien
4 heures après	id.	id.	id.	rien	rien
				La démarcation des deux liquides est à peine perceptible.	
2 jours après	id.	id.	id.	id.	

III. — Solution de fluorure de sodium

CONCENTRATIONS	5 %	2 %	1 %	0.5 %
Aussitôt après la manipulation	densité de l'antiseptique plus grande que densité du sérum.	rien	rien	rien
une demi-heure après	le sérum et la solution se mélangent	rien	légère opalescence	rien
1 heure après	id.	rien	id.	rien
2 jours après	id.	rien	opalescence très accusée	rien

D'après ces expériences, il est facile de déduire que la concentration de la solution antiseptique telle qu'au contact du sérum normal de cheval il n'y ait aucune réaction de floculation dans un temps minimum d'une heure, doit être :

a) Pour le formol : à plusieurs taux, 1 %, 2 %, 5 % et même 10 %.

b) Pour l'acide phénique : à 5 p. 1000 et même 1 %.

c) Pour le fluorure de sodium : à 0,5 %.

A 2 %, nous avons trouvé des résultats contradictoires.

Ce temps minimum d'une heure que nous avons noté est très suffisant pour effectuer une réaction d'Ascoli. En effet, lorsque nous mettons en présence l'extrait charbonneux additionné d'antiseptiques et le sérum précipitant, il ne faut pas que le trouble provoqué par ces antiseptiques vienne fausser les constatations et puisse nous faire croire à une réaction d'Ascoli positive. Or, nous savons que le sérum précipitant employé en vue du diagnostic est suffisamment actif pour faire apparaître immédiatement la réaction zonale. Par conséquent, ce délai d'une heure nous donne toute sûreté pour l'interprétation des résultats. Nous avons repris ces expériences avec une rate charbonneuse conservée à la glacière pendant plusieurs semaines. Nous en avons prélevé quelques fragments, auxquels nous avons ajouté dans une première série du formol aux différents taux indiqués; dans une seconde, de l'acide phénique et enfin, dans une troisième, du fluorure de sodium. C'est à partir de ce matériel que nous avons opéré pendant plusieurs semaines des réactions d'Ascoli; il est toujours resté sans altération à la température ordinaire pendant tout le temps qu'ont duré nos expériences. L'extrait était préparé à chaud dans de l'eau physiologique, selon la technique de M. Rinjard; nous nous sommes servi du sérum délivré par l'Institut Pasteur. Avec le formol à

10 %, nous avons constaté que le produit charbonneux (moitié sang, moitié rate) formait un coagulum au bout de quelques heures et se conservait ainsi à l'air sous cet aspect; l'extrait était aussi préparé à chaud et avec la même facilité.

Nous avons toujours obtenu des réactions positives, quelle que soit la durée de conservation du matériel par les antiseptiques; même avec des antigènes formolés, préparés par M. Rinjard en août 1926 et en août 1927, l'anneau s'est produit presque immédiatement.

Nous signalerons maintenant les quelques avantages que nous croyons conférer à ce procédé. Le fait d'ajouter un antiseptique à l'échantillon permet de le recevoir au Laboratoire dans de très bonnes conditions; la putréfaction, qui a été signalée par tous les auteurs comme très gênante pour entreprendre des recherches et faire les manipulations, n'existe plus. Les gaz dus à la fermentation, qui souvent était cause de l'ouverture du flacon en cours de route et de la souillure du paquet, ne se produisent plus.

Il suffit de faire par ponction une prise de sang à la jugulaire sur le cadavre, de récolter ainsi une dizaine de centimètres cubes de sang virulent et d'ajouter sur place quelques centimètres cubes de solution formolée ou autre. Le tout est mis dans un tube à verre épais, fermé par un bouchon en caoutchouc (ces tubes sont envoyés par le Laboratoire de Recherches à tous les vétérinaires qui en désirent en vue des prélèvements qu'ils peuvent faire dans leur clientèle). Cette

prise de sang sera suffisante pour permettre un diagnostic précis avec l'Ascoli et ainsi le praticien pourra se dispenser de faire l'autopsie de l'animal, opération dangereuse et qui souille le sol où elle est pratiquée. Si toutefois l'autopsie avait été faite, un morceau de rate gros comme un œuf de pigeon suffira amplement à établir le diagnostic.

Il est facile au vétérinaire, à la campagne, d'avoir, avec tous les médicaments qu'il transporte, une solution toute prête de formol ou d'acide phénique, etc... et de faire sur place le mélange au sang qu'il vient de prélever sur le cadavre suspect d'être atteint de charbon ou d'autre maladie même. La manipulation, à notre avis, est des plus faciles. L'expédition faite, il reçoit du Laboratoire, dans les vingt-quatre à quarante-huit heures au plus, le résultat de l'examen par télégramme, ce qui est encore un avantage de la réaction d'Ascoli, car elle permet de renseigner un praticien par retour de courrier, alors que les cultures ou les inoculations demandent un temps beaucoup trop long.

Conclusions

I. — Le diagnostic de la fièvre charbonneuse ne peut être fait ni sur l'animal vivant, ni sur le cadavre ; il faut rechercher l'agent causal ou les substances spéciales qu'il sécrète par des méthodes appropriées.

II. — La recherche de la bactériodie est souvent entravée par les phénomènes de putréfaction qui se produisent dans le cadavre et qui la détruisent rapidement. Cependant, avec certaines méthodes (Johne, Olt, Rübiger, Klett, et surtout Mac on peut arriver à caractériser la gaine de la bactériodie. La spore se colore bien par la méthode de Möller.

III. — Il est à noter que certains microbes ressemblent étrangement aux bacilles charbonneux et comme eux possèdent une gaine. Même la culture est le plus souvent insuffisante pour faire la différenciation. La culture et l'inoculation ne sont possibles que quand on dispose de produits frais, ce qui arrive rarement.

IV. — Afin de se procurer des produits susceptibles de renfermer encore la bactériodie, on a employé une série de procédés dont l'un d'eux a donné d'excellents résultats : c'est dans la moelle osseuse que la bactériodie se conserve le

mieux ; elle y résiste une vingtaine de jours. On s'adresse aux métacarpiens ou aux métatarsiens.

V. — Les méthodes de conservation des produits suspects facilitent énormément la tâche du Laboratoire ; c'est pourquoi nous avons pensé leur additionner un antiseptique afin d'opérer les recherches sur un matériel non putréfié, plus facile à manipuler et sans danger.

VI. — La précipito-réaction d'Ascoli, en recherchant les anticorps charbonneux, est une méthode infallible à condition de posséder un bon sérum. Cette réaction est pratiquée couramment aujourd'hui dans les Laboratoires avec le sérum de l'Institut Pasteur qui convient très bien. Elle est spécifique et s'obtient très rapidement.

VII. — Les produits charbonneux auxquels nous ajoutons l'un des antiseptiques que nous venons d'étudier :

Formol (5 à 10 %).

Acide phénique $5 \frac{0}{100}$ ¹ ~~$1 \frac{0}{100}$~~

Fluorure de sodium (0,5 %).

perdent leur virulence et arrivent en bon état au Laboratoire. Ils peuvent être transportés sans aucun danger et permettent d'effectuer la Réaction d'Ascoli avec une entière rigueur.

Vu : le Doyen,

H. ROGER.

Vu : le Président,

A. LEMIERRE.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

Bibliographie

- J. COURMONT et L. PANISSET. — Précis de Microbiologie des maladies contagieuses des animaux domestiques. O. Doin, Paris, 1914.
- MÉNÉTRIER. — Nouveau Traité de Médecine et de Thérapeutique (Brouardel et Gilbert). Maladies communes à l'homme et aux animaux. Article sur le charbon.
- CARNEIRO FILHO. — Thèse. Essais sur le diagnostic bactériologique du charbon bactérien. Recherche de la bactériémie dans la moelle osseuse. Valeur de la réaction d'Ascoli, 1925.
- METTEY P. — Thèse. L'état actuel de nos connaissances sur le diagnostic du charbon bactérien. Etude critique et expérimentale, 1926.
- JOHN MAC FADYEAN. — Une réaction spéciale du sang des animaux morts de charbon. *The Journ. of comparative Path. and Therapeutics*, mars 1903, p. 35. *Anal. in Rev. gén. de Méd. vét.*, 1903, T. II, p. 430.

- JOHN MAC FADYEAN. — Nouvelle note relative à la coloration du sang charbonneux avec le bleu de méthylène. *The Journ. of comparative Path. and Therapeutics*, décembre 1903, p. 360. *Anal. in Rev. gén. de Méd. vét.*, 1904, T. IV, p. 183.
- BESSEMAN et LEYNEN. — Recherches sur le diagnostic de laboratoire du charbon bactérien (bacilles anthracoides). *Ann. de Méd. vét.*, Bruxelles, août-septembre 1922.
- KAESWURM. — Sur le diagnostic bactériologique du charbon par le procédé des plaques, principalement au point de vue de la différenciation du bacille pseudo-charbonneux. *Zeitsch. für Fleisch. und Milchhygiene*, février 1904. *Sign. in Rev. gén. de Méd. vét.*, 1904, T. III, p. 214.
- BOUGERT. — Beiträge zur Biologie des Milzbrandbazillus und sein Nachweis im Kadaver der grossen Haustiere. *Centralbl. für Baktériol.*, I, Originale, septembre-novembre 1903, T. xxxiv et xxxv. *In Rev. gén. de Méd. vét.*, 1904, T. IV, p. 661.
- SCHAFFER. — La coloration de la bactérie d'après M. Fadyean. *Zeitsch. für Fleisch. und Milchhygiene*, mars 1904. *Sign. in Rev. gén. de Méd. vét.*, 1904, T. III, p. 330.
- J. VERGE. — Sur la résistance à la chaleur des spores charbonneuses. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1923.

SCHILLING. — Atténuation par les substances chimiques. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1926.

P. KAESTNER. — Bemerkung zu dem Artikel Fischhøeders « zum Nachweis des Milzbrandes durch Zuchtung ». *Zeitsch. Infektionskrankheiten der Haustiere*, 1906, Bd. I, pp. 216-219. *Sign. in Rev. gén. de Méd. Vét.*, 1906, T. VII, p. 511.

HARNACH. — Sur la perte de la colorabilité des gaines de la bactériodie charbonneuse. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1926.

DENO GETOR. — Diagnostic bactériologique rapide du charbon au moyen d'une microméthode. *Bulletin de l'Inst. Pasteur*, 1928.

STAUB et FORGEOT. — Sur un moyen de vaincre rapidement la résistance de la spore charbonneuse à l'action de l'alcool-éther. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1921.

BOZELLI. — Sur la conservation du matériel charbonneux dans les fibres des tiges de *Ferula communis*. *Il moderno zooiatro*, 30 septembre 1902, p. 382; *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1914.

FORSTER. — Sur un moyen de recherche de la bactériodie charbonneuse dans le sang et les tissus. *Centralbl. für Bakteriöl.*, 10 mars 1906, Originale Bd. XL, Heft 5, pp. 751-753. *Anal. in Rev. gén. de Méd. vét.*, 1906, T. VIII, pp. 438-440.

- REINECKE. — L'état actuel du diagnostic du charbon. *Zeitsch. für Veterinärkunde*, mai 1905, p. 193. *Anal. in Rev. gén. de méd. vét.*, 1906, T. VII, p. 313.
- MARXER. — Recherches pratiques sur une nouvelle méthode pour le contrôle du diagnostic de la fièvre charbonneuse. *Zeitsch. für Fleisch. und Milchhygiene*, février 1905. *Sign. in Rev. gén. de Méd. vét.*, 1905, T. V, p. 228.
- DAUSEL. — Sur le diagnostic du charbon. *Zeitsch. für Fleisch. und Milchhygiene*, avril 1906. *Sign. in Rev. gén. de Méd. vét.*, 1906, T. VII, p. 448.
- CARL. — Diagnostic du charbon. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 16 juillet 1904. *Sign. in Rev. gén. de Méd. vét.*, 1904, T. IV, p. 141.
- MARCHISOTTI. — Contributio al diagnostico della fiebvre carbunclosa. Resista della Faculta de agronomia y veterinaria de la Plata, 1917, T. XII. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1918.
- FREY. — Problems in anthrax control. *Journ. of the American veterinary medical Association*, mai 1919.
- CIUCA et STOICESCO. — Diagnostic bactériologique du charbon par les cultures de la peau. *Arch. vét.*, mars-avril 1909, pp. 71-85. Réunion biol. de Bucarest, in *C. R. de la Soc. biol.*, 1909, T. LXVII, p. 140.

- M. MÜLLER et A. ENGLER. — Ueber die Erhöhung der Leistungsfähigkeit des Strassburger Verfahrens zum Nachweis von Milebrand. *Zeitsch. für Infektionskrankheiten der Haustiere*, 6 octobre 1910, Bd. VIII, Heft 4-5, pp. 346-353. *Anal. in Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1911.
- SANI. — Sur la valeur de la méthode de Wülff pour le diagnostic du charbon hémattique. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1918. *Rev. gén. de Méd. vét.*, 1918.
- WÜLFF. — Diagnostic du charbon par l'examen de la moelle. *Berliner tierärztliche Wochenschrift*, 13 juin 1912.
- RIESEL. — Contribution à l'étude de la pathologie du charbon chez l'homme. *Zeitsch. für Hygiene*, 6 mars 1903, T. XLII, p. 301. *Anal. in Rev. de Méd. vét.*, 1904.
- PRZESMYCKI et SZCZUKA. — Recherches sur la thermoprécipitation d'Ascoli. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1927, T. II.
- FLEMMING. — Séro-diagnostic du charbon bactérien par la thermoprécipitation d'Ascoli. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 10, 17 et 24 février 1912.
- SCHÜTZ et PFEILER. — Nouvelles recherches sur le diagnostic du charbon au moyen de la méthode de précipitation. *Archiv. für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde*, mai 1914, Bd. XL, Heft 5 et 6. *Anal. in Rev. gén. de méd. vét.*, 1918.

BESSEMANS et LEYNEN. — Recherches sur le diagnostic de laboratoire du charbon bactérien. *Ann. de Méd. vét.*, Bruxelles, août-septembre 1922.

C. CERNAIANU. — Réaction de précipitation d'Ascoli, en présence d'un extrait préparé à froid, pour le diagnostic du charbon bactérien. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1926, T. I.

ASCOLI. — Les précipitines dans le diagnostic du charbon bactérien. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1911, T. LXX, p. 194.

H. VALLÉE. — Sur la concentration des anticorps coagulants. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1913, T. LXXIV, p. 1.065.

FISCHCEDER. — Le diagnostic de la fièvre charbonneuse. — *Fortschritte des Veterinär Hygiene*, avril-mai-juin 1903, pp. 1, 64 et 106. *Anal. in Rev. de Méd. vét.*, 1904, p. 191.

ERRATA

Page 15 — 13^e ligne : un : manque après John.

— 17 — 10^e — : au lieu de *celles*, lire *celle*.

— 32 — 2^e — : au lieu de *Möller*, lire *Möler*.

48 — 8^e — : au lieu de *dans de différents*, lire *dans différents*.

— 49 — 12^e — : au lieu de *charbonneuses*, lire *charbonneuse*.

— 58 — 1^e ligne tableau : au lieu de 5 % lire 5 ‰.

— 63 — 9^e — : lire *Fadyean*) on peut arriver... etc.

— 63 — 10^e — : au lieu de méthode de *Möller*, lire *Möler*.

66 — 17^e — : au lieu de *Nachwis*, lire *Nachweis*.

— 69 — 3^e — : au lieu de *Nachwzis von Milebrand*, lire *Nachweis von Milzbrand*.



Imprimerie « LES PRESSES MODERNES », 45, rue de Maubeuge, Paris
Ateliers à Reims (Marne)

